

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-308184

(43) 公開日 平成7年(1995)11月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M	1/34 1/28 1/30	B		
C 1 2 Q	1/14 1/18	6807-4B 6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平6-125740

(22) 出願日 平成6年(1994)5月16日

(71) 出願人 390041450

日本ミリボア株式会社

東京都品川区北品川1丁目3番12号 第5
小池ビル

(71) 出願人 591044898

セルテックラボラトリー株式会社

東京都東村山市恩多町5-38-15

(72) 発明者 大澤 尚美

東京都東村山市恩多町5-38-15 セルテ
ック ラボラトリー株式会社内

(72) 発明者 石曾根 博之

東京都小金井市緑町2-7-20

(74) 代理人 弁理士 木村 正巳

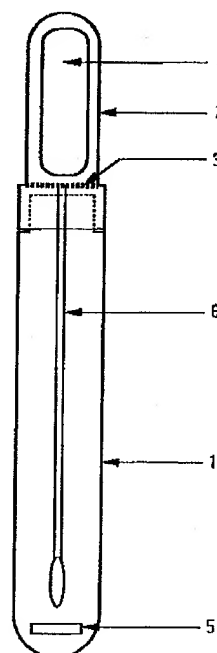
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 耐性菌の簡易検知装置

(57) 【要約】

【目的】 多剤耐性菌以外の細菌を抑制する抗生物質、マンニット及びフェノールレッドを含有する培養液中で被検細菌を培養し、培養前後の培養液の色の変化によって多剤耐性菌の存在を検知する長期保存性を有する簡易検知装置とこれを用いる多剤耐性菌の検知方法を提供する。

【構成】 マンニット及びフェノールレッドを含有する培養液をガラスアンブルに封入すると共に、多剤耐性菌以外の細菌を抑制する抗生物質をディスクチップに含浸、凍結乾燥させ、使用時に培養液中に抗生物質を溶解させる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】菌を培地で培養して培地の変化を観察することにより菌を検知する装置において、外力の作用により互いに一体的に接触する菌採取端、抗生物質及び培地を包含してなり、少なくとも前記抗生物質と培地とが非接触的に収容容器に配置されていることを特徴とする選択的耐性菌検知装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、長期保存性にすぐれ、操作が簡単で、携帯し易い耐性菌、特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; 以下、MRSAと略記) などの検知装置に係わる。

【0002】

【従来の技術】近年の医療の高度化、治療の進歩により、抗菌薬、免疫抑制薬などが治療手段として広汎に使用され、その恩恵を受けている。しかしながらその反面、二次的現象として多くの耐性菌が産出されていることも否めず、難治感染症の原因の一つとなっているMRSA群はその代表的なものであり、医療上大きな問題となっている。特に重症患者を治療する集中治療室内での感染、老人ホームなどにおける抵抗力の弱った人への感染は、腸炎や肺炎を惹き起こし、有効な薬物治療法がないため肺血症で死亡する例が増えている。

【0003】また、これらMRSAだけでなく、多剤耐性コアグラーゼ陰性ブドウ球菌 (*Coagulase negative Staphylococcus*) (以下、多剤耐性CNSと略記) などが医療従事者からも多く検知され、年々増加する傾向にある。

【0004】これに対し、MRSAや多剤耐性CNS感染症を増やさないためには、感染の早期発見を行い、的確な防止対策をとることが重要と考えられる。特に、この感染の早期発見に当たっては、早く、簡単に、確実に、かつ安価に、より多くの検体をスクリーニングできることが強く望まれてきている。

【0005】従来の技術は、患者検体や医療環境から採取した検体を耐性菌用の選択培地を用いた寒天平板培地上で培養し、培地上に形成されたコロニーを目視観察すると共に、その他の検知確認手段を用いて耐性菌を確認、検知する方法が採用されており、例えば、吉田繁らは「迅速かつ簡便なメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 検知用寒天平板の開発」を臨床病理 (41巻 9号 p. 1037~1042 (1993)) に発表し、さらに最近では、ポリメラーゼ連鎖反応 (以下PCRと略記) を用いたMRSAの判定方法が提案され、適用されてきている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上述の従来の方法は、いずれも操作上煩雑であること；寒天培地上に生育したコロニーを判定するため、検知に当たり専門技術又は熟練が必要であること；使用する生の培地

においては抗生物質の活性低下が避けられず、長期保存ができないこと；検知費用が高いことなどの欠点を有し、さらにPCRを用いた方法では、例えばMRSAの耐性遺伝子 *mecA* 遺伝子を増幅することが考えられても、MRSA以外にも *mecA* 遺伝子を含有するブドウ球菌が存在することによる精度の問題を有する上に、現状では大学付属病院など一部で実施されているにすぎない。また特に菌検知に簡便好適な装置として、特開昭62-171671号には、液体培地をカプセルに収容し、さらに菌採取用のタンポンと共に該カプセルを容器内に収容した装置が提案されているが、添加された抗生物質は液体培地においても経時的に活性を失い、耐性菌を選択的に検知するには信頼性が乏しいことは否めない。

【0007】

【課題を解決するための手段】これらの事情に鑑み、鋭意研究の結果、長期保存性に優れた携帯し易い選択的耐性菌検知装置を開発し、これを使用することにより、専門技術を必要とせず、24~48時間内に耐性菌、例えばMRSAや多剤耐性CNSの検知を行い得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】即ち、菌を培地で培養して培地の変化を観察することにより菌を検知する装置において、菌採取端、抗生物質及び培地を包含してなり、使用前 (すなわち培養前) には少なくとも前記抗生物質と培地とが非接触的に、菌採取に続く培養時には、外力を作用させて前記菌採取端、抗生物質及び培地を一体的に接触させるように収容容器に配置されていることを特徴とする選択的耐性菌検知装置を開発し、本発明に至った。

【0009】ここに、菌採取端とは綿棒構造で代表されるが、採取対象が液状を呈する場合には少なくとも部分的にゴムやエラストリック性あるいは可撓性を有する材料からなるパイプ状のスポート機能を持つものや、先端が種々の形のスパチュラ構造でもよく、要するに菌の採取に好適な形状で無菌の収容容器に無菌状態で収容可能であり、かつ菌採取後に培地と十分に接触し得る構造である限り、あらゆる構造を採用し得る。また、菌採取端は後述する抗生物質や培地とは使用前に接触しない状態で収容されることが好ましいが、抗生物質とは若干の接触があっても構わない。

【0010】抗生物質は検知対象である耐性菌との関係から種類が選定され、特に培地量との関係から適量が決定される。抗生物質を予め培地に添加すると装置はよりコンパクトになるが、残念ながら先に述べた通り、抗生物質の活性が経時的に低下することが多く、長期保存可能な耐性菌の選択的検知装置にあっては、これら抗生物質と培地とを非接触的に収容することが不可避と言える。収容形態としては直接容器内に粉末状で収容することも可能だが、水その他の適切な溶媒に溶解せしめ、適量を担体 (例えば濾紙等) に含浸し、凍結乾燥してディスクチップの形で収容するほか、収容容器内の好ましく

は培養する空間（以下培養部と呼称する）となるべき部位にこの溶液を添加し、減圧乾燥等の方法でコーティングして収容するとか、あるいは又これら粉末や溶液を破壊可能なアンブルやカプセルに充填して収容しても構わない。収容容器内のいずれの部位に収容されてあっても、培養前に容器を振るとか、液体培地で洗い流すとかにより培地と接触可能な状態で収容であれば、培養前に培地と非接触状態を保つ限り如何なる収容方法を採用しても構わない。

【0011】培地としては検知しようとする耐性菌に対して公知の培地あるいはその改良培地を使用できる。培地は好ましくは液体状態であり、アンブルもしくはカプセルに充填、収容されることが望ましいが、これに限定されるものではなく、例えば壊れ易い隔壁により前記抗生物質と接触しないように収容された寒天培地でもよく、この場合、培養時壊れ易い隔壁を該隔壁上に載置されているガラスでコーティングした鉄片を外部マグネットを介して破壊するとか、綿棒の硬い材質で出来た棒部分で突き破り、抗生物質と水のカプセルを破壊して溶液として培地上に流し込むなどして採取端の菌を抗生物質及び寒天培地と接触させる。ちなみに、寒天培地の代わりに乾燥培地を収容して、収容容器内に種々の形態で収容された水で常用の寒天培地に復帰せしめることも可能である。また培地には培養結果を正確に判定できるように、pH指示薬や、菌によって分解されて分解産物が菌の増殖を示す指標となる化学物質の添加を行っても良いが、これらは多量に存在すると培養を阻害するものもあるので適量で添加されることは当然である。

【0012】上述の採取端及び抗生物質に関する種々の収容形態、並びに培地に関する種々の収容形態の選定、組合せについては、発明の趣旨を逸脱しない限り数多くの組合せが許容される。特に、抗生物質及び培地（特に液体培地）の両者とも、あるいは一方を合成樹脂やガラス製のアンブルやカプセルに収容しこれらを破壊することにより抗生物質及び培地を一体化させる際には、収容容器のカプセル又はアンブルの収容部が可撓性を有していることは、割り具などにより外部から力を作用させてこれらカプセル又はアンブルを容易に破壊することができるため好ましい。特に物理化学の実験に用いられる各種の破壊しやすい（ブレイカブルな）機構を有したアンブルやカプセルは適用するに好ましい。収容容器はコンパクトなほど好ましいが、培養に必要な空気が存在し得る体積が確保し得ることは不可欠である。また収容容器の形状は全体として円筒形のもの積載上好ましいが、シャーレ形の円盤上面に突起が出たような形状なども採用でき、発明の趣旨を逸脱しない限りあらゆる形態が許容され、材質も各種の培地や抗生物質に不活性な合成樹脂、天然ゴム、合成ゴム、各種ガラス、各種金属が全体的あるいは部分的に選定使用し得る。

【0013】更にMRSA検知を想定した本発明による具体

的装置の1例である図1をもとに詳述する。この検知装置は、上端で開口し、下端で閉止した透明な下部チューブ1と；上端で閉止し、下端が多孔板3によって閉止され、前記透明な下部チューブ1の開口上端と気密に係合して、透明な下部チューブ1を封止するキャップを兼ねると共に、後述する培養液が封入されたガラスアンブル4を前記閉止された上端と下端多孔板3との間に収容する可撓性合成樹脂からなる上部チューブ2と；一端が前記多孔板3に保持され、他端が前記透明な下部チューブ1内に伸びる菌採取用の綿棒6と；前記透明な下部チューブ1内に入れられた前記耐性菌以外の菌の生育を抑制する後述の抗生物質を含浸した乾燥ディスクチップ5を包含してなる。

【0014】ここに、培養液は、マンニット食塩培地、スタフィロコッカスブイヨン等の一般的な液体培地のいずれでもよく、指示薬としてフェノールレッドを含有し、培養液の初期pHは7.4で、赤色を呈している。また、乾燥ディスクチップ5は、耐性をもたないグラム陽性球菌を抑制するオキサシリン、グラム陰性桿菌を抑制するアゾトレオナム及びポリミキシンBの抗生物質を含有する。乾燥ディスクチップ5は、吸着担体として合成樹脂や天然樹脂の特に繊維の集合体であれば種類を問わないが、セルロースペーパーチップが最適である。

【0015】かくして、少なくとも抗生物質と培地とは接触しない状態で収容されているので、長期保存が可能な耐性菌の簡易検知装置を提供し得ることとなる。

【0016】

【作用】本発明の検知装置の使用に当たっては、予め滅菌又は除菌されている菌採取端を収容容器から取り出し、手早く被検体と接触させて菌を採取し、迅速に再び収容容器内に気密に収納し、次いで容器外部から外力を作用せしめて非接触状態を保持していた菌採取端、抗生物質及び培地を一体的に混合接触させ、常法により一定時間一定温度のもとに培養し、培地の濁り、コロニーの成長、増殖した菌に由来の産生物質に基づく物理化学的な性状の変化を「培地の変化」として検知するとか、あるいはまた予め培地に添加しておいた化合物の増殖した菌による分解などに基づく培地の物理化学的な性状変化を「培地の変化」として観測して菌の存在を判定することを意味する。もちろん、培養後に、収容容器から培地を取り出して以上の観測をすることも可能ではあるが、そのまま観測し得ることが好ましく、収容容器の少なくとも培養状況を観測する部位が透明であることが好ましい。もしも逆に透明であるために収容されている抗生物質や培地が光によってその性状を変化させる虞がある場合には、当該透明部に遮光のための被覆、例えば黒色のテープを巻き付けておくことが好ましく、特に培地の変化を観測する際に取り外し易いほど好適である。

【0017】培地として寒天培地を用いる場合は、寒天培地の上部にある隔壁を薄く構成し隔壁を綿棒で突き壊

す方法に続いて、抗生物質を含むカプセル、水を含むカプセルを外力を作用して破壊して培地上に均一に供給する方式が好ましい。

【0018】以上、外力を作用してカプセル、アンブルあるいは隔壁を破壊することについて種々説明してきたが、要するに、収容容器の外部から力を作用させる際、たとえ収容容器が変形しても培養には差し支えないものである限り、あるいはまた培養系と外部とが遮断されている限り、換言すれば、収容容器内が外気によって汚染されることなく、菌と培地と抗生物質とが培養系を形成できる限り如何なる力の作用も可能であり、こみや軽い衝撃などあらゆる力の作用をも採用し得る。

【0019】再度、図1を参照しながら、具体例をMRSA検知方法について記述する。本発明の「検知装置を使用する」に当たっては、上部チューブ2を下部チューブ1からはずし、上部チューブ2を持って綿棒6の先で患者の鼻腔粘膜、咽頭、又は被検査対象の区域の床、壁、又は区域内にある家具等の表面を擦る。ついで、検体を採取した上部チューブ2を元のように下部チューブ1に差し込み、係合させて気密に封止する。上部チューブ2内に保持してある培養液が封入されたガラスアンブル4を外から例えば市販の割り具を用いて割り、封入された培養液を多孔板3を通過して、綿棒6に沿って下部チューブ1内に落下させ、綿棒の先が培養液内に浸るようにする。この際、割れたガラスは多孔板3の上に残り、培養後の観察に支障を来すことはない。下部チューブ1内に入った培養液は前述の抗生物質を含浸した乾燥ディスクチップ5と接触し、乾燥ディスクチップ5に保持された抗生物質が培養液に溶解する。ついで、下部チューブ1に上部チューブ2を係合した状態で35℃下に24～48時間培養する。培養後、MRSAが存在すると、これらは培養液中のマニットを分解するため培養液のpHが酸性となり、指示薬フェノールレッドの色調が赤色から黄色に変色する。従って、判定に当たっては、培養液の黄変によって耐性菌の存在が検知できる。

【0020】存在が検知された菌がMRSAであるか他の耐性菌であるかについての判定に当たっては、陽性反応を示した試料について、その培養液の一部をとり、常法どおりこれに4-メチルウンベリフェリリン酸を添加し、さらに1～2時間培養した後、MRSAが産生するフォスファターゼにより生じた4-メチルウンベリフェロンの蛍光を波長365nmで検知することにより確認し得る。併せて、陽性反応を示した試料の他の一部を、やはり常法どおりウサギプラズマを含有する溶液に添加し、培養した後、MRSAが産生するコアグラゼによって生ずるゲル化反応を確認して、多剤耐性菌がMRSAであると判定できる。

【0021】この場合、4-メチルウンベリフェリリン*
試験結果

検体の種類

*ン酸についても、上述の抗生物質と同様に、ディスクチップに含浸、凍結乾燥し、一方ウサギプラズマについては、ゼラチン水溶液に溶解後、円柱状に成形し、凍結乾燥してチップとすることにより長期保存性が確保される。

【0022】以下に実施例を挙げて、本発明の具体的使用例を記述するが、発明を限定するものではない。

【0023】

【実施例1】トリプトン 1.0 (w/v) % (以下単に%で表示)、ラクトース 0.20%、イーストエクストラクト 0.25%、D-マンニット 1.0%、塩化リチウム 0.50%、塩化ナトリウム 0.40%、フェノールレッド 0.17%及び精製水からなる液体培地1.5mlをガラスアンブルに封入し、121℃、120分間で滅菌処理を行った。抗生物質については、培養液濃度でオキサシリン (6 μ g/ml)、アズトレオナム (5 μ g/ml) 及びポリミキシン B (10 μ g/ml) となるようにディスクチップに含浸させ、凍結乾燥させた。ガラスアンブル及び乾燥ディスクチップを収容した図1の装置を用いて下記の試験を行った。

【0024】生検検体は、A病院に入院するMRSA罹患患者20名、及び医療従事者20名から採取したものである。対照としての陽性標準検体 (n=10) に関しては、検定済みの多剤耐性標準検体1としてMRSAを及び陽性標準検体2として多剤耐性CNSをそれぞれ104/チューブで使用した。陰性標準検体としてはスタフィロコッカス・エピデルミディス (Staphylococcus epidermidis) を104/チューブで使用した。各被検者の咽頭、鼻腔、手指から綿棒にて検体を採取し、綿棒を樹脂 (ポリエチレン:以下単に樹脂と記載) 製の下部チューブ内に入れ、キャップを気密に係合した後、樹脂製の上部チューブ内の液体培地封入ガラスアンブルを上部チューブの外から割り具によって割り、液体培地を下部樹脂製チューブに流入させた。培養温度35℃で24～48時間培養後、培地変化の判定を行った。判定は培地の色調変化を観察して行い、赤色のままのものを陰性、黄色に変色したものを陽性と判定した。

【0025】なお、培地が黄変した陽性検体につき、さらにフォスファターゼ及びコアグラゼ産生の有無を4-メチルウンベリフェロンの蛍光及びウサギプラズマのゲル化で検討した。

【0026】多剤耐性菌の存在に関する培地の変色による試験結果を表1に、陽性検体について行ったフォスファターゼ及びコアグラゼテストの結果を表2にそれぞれ示す。

【0027】

【表1】

7

8

対象部位	MRSA罹患患者 (培地の色調変化)	医療従事者 (培地の色調変化)
咽 頭	20/20	3/20
鼻 腔	20/20	2/20
手 指	12/20	4/20
陽性標準検体1	10/10	
陽性標準検体2	10/10	
陰性標準検体	0/10	

【0028】

* * 【表2】

試験結果

対象部位	検 体 の 種 類			
	M R S A 罹 患 患 者		医 療 従 事 者	
試験	フォスファターゼ試験	コアグラゼ試験	フォスファターゼ試験	コアグラゼ試験
咽 頭	20/20	20/20	2/20	2/20
鼻 腔	20/20	20/20	1/20	1/20
手 指	8/20	8/20	2/20	2/20
陽性標準検体1	10/10	10/10		
陽性標準検体2	10/10	10/10		
陰性標準検体	0/10	0/10		

【0029】上記表1及び表2において、試験結果を以下のように表示している。

液体培地の色調変化：培地の色調が赤色から黄色に変化した例数/総検体数

フォスファターゼ試験：青色に蛍光を発した陽性例数/総検体数

コアグラゼ試験：ウサギアラズマ溶液がゲル化した陽性例数/総検体数

【0030】表1から明らかなように、検知結果はMRSA罹患患者の咽頭、鼻腔においては全例陽性であった。手指は60%の検知率であった。医療従事者の咽頭、鼻腔、手指においては、それぞれ15%、10%、20%の検知率であった。

【0031】さらに液体培地の色調が赤色から黄色に変化した陽性例に対して行ったフォスファターゼ試験及びコアグラゼ試験では、表2から明らかなように、MRSA罹患患者の咽頭、鼻腔においては全例陽性であった。手指は60%の検知率であった。医療従事者の咽頭、鼻腔、手指においては、それぞれ10%、5%、10%の検知率であった。このことは、医療従事者における本発明の簡易検知装置での陽性結果とフォスファターゼ試験あるいはコアグラゼ試験での陽性結果との差は、MRSA以外に、同じ多剤耐性を有するCNSも検知されていたことを意味する。

試験結果

検 定 菌	本発明の検知装置		市販MRSAスクリーニング用寒天培地	
	A	B	C	D
MRSA	3/3	3/3	3/3	3/3
CNS	3/3	3/3	3/3	3/3
S. エンテリカリス	0/3	0/3	1/3	3/3
S. アウリス	0/3	0/3	0/3	3/3

※する。

【0032】

【実施例2】実施例1で調製した本発明の簡易検知装置を用い、従来法との保存安定性について比較検討した。従来法では市販のMRSAスクリーニング用寒天平板培地（フードスタンプ「ニッスイ」MSO寒天；日水製薬株式会社）を用い、寒天平板培地を冷蔵で3ヶ月間保存した後使用した。一方、本発明の簡易検知装置は15℃で1年間及び40℃で2ヶ月間保存した後使用した。試験は各検定菌毎3回行った。

【0033】検定に当たり、グラム陽性菌としてMRSA、CNS、スタフィロコッカス・エピデルミディス、スタフィロコッカス・アウレウス、エンテロコッカス・フェカリス（*Enterococcus faecalis*）、グラム陰性菌としてエシェリキア・コリ（*Escherichia coli*）、クレブシエラ・ニューモニエ（*Klebsiella pneumoniae*）、セラチア・マルセッセンス（*Serratia marcescens*）、プロテウス・ブルガリス（*Proteus vulgaris*）、シュドモナス・アエルギノーザ（*Pseudomonas aeruginosa*）を104/チューブで使用して試験を行った。

【0034】得られた結果を表3に示す。

【0035】

【表3】

9				10
E. フェリス	0/3	0/3	1/3	3/3
E. コリ	0/3	0/3	0/3	2/3
K. ニューモニ	0/3	0/3	0/3	3/3
S. マルティネス	0/3	0/3	0/3	3/3
P. アルガリス	0/3	0/3	0/3	2/3
P. フロリダノス	0/3	0/3	0/3	3/3

A: 15℃、1年間保存 B: 40℃、2カ月間保存 C: 冷蔵下、1週間保存 D: 冷蔵下、3カ月保存

【0036】以上の結果より、本発明の簡易検知装置においては、15℃で1年間及び40℃で2ヶ月間の保存品の両者供、MRSA及びCNSの全例に液体培地の色調の黄変（陽性）が認められ、その他の菌においては総て陰性を示した。従来法である市販の寒天培地は、冷蔵で3ヶ月間保存したものでは、MRSA及びCNS以外の菌も同様に発育し、正しくMRSA及びCNSを検知することが出来なかった。このことは、寒天培地中に含有する抗生物質の分解が生じ、MRSA及びCNS以外の菌の増殖抑制が弱まった結果と考えられる。このように市販の寒天培地においては、保存安定性に問題があった。本発明の簡易検知装置においては、抗生物質が凍結乾燥されたディスクチップとガラスアンプルに封入された液体培地とが培養直前まで簡易検知装置内に分離され接触していないため、抗生物質がその活性を安定に保ち、長期保存が達成し得る。

【0037】

【発明の効果】本発明による簡易検知装置は、菌採取端、培地及び抗生物質を収容容器内に被接触的にかつ*

* 括収容されているため、長期保存が可能な耐性菌検知作業に好適な装置を提供し、その結果として菌採取から培養までの操作及び培養後の判定操作が非常に短時間になり得るものであり、熟練及び専門知識を要することなく、確実に、多数の検体を処理できる方法を提供するものである。従って、多数の採取検体の耐性菌感染の早期発見が可能となり、問題になっているMRSAなどの院内感染防止対策の一助とすることができる。また、抗生物質に限らず保存不安定な培地を分割収容して安定性を付与した培養装置に応用、適用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による多剤耐性菌の簡易検知装置の概略図である。

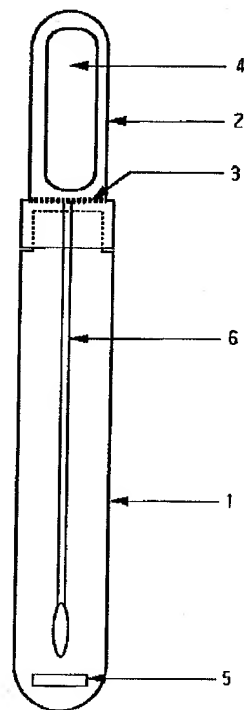
【符号の説明】

- 1 下部チューブ
- 2 上部チューブ
- 3 多孔板
- 4 ガラスアンプル
- 5 乾燥ディスクチップ
- 6 綿棒

(7)

特開平7-308184

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 三和 亜通志

千葉県千葉市若葉区御成台1-6-4